

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.001

· 基础研究 ·

利用慢病毒载体观察 microRNA-194 对人骨肉瘤细胞系 U2-OS 生物学特性的影响 *

韩 康^{1,2#} 赵廷宝^{2#} 卞 娜¹ 蔡成魁¹ 颜世举¹ 王 鑫¹ 肖 春¹ 沙 浩¹董 川¹ 杨彤涛¹ 周 勇^{1Δ} 马保安^{1Δ}

(1 第四军医大学唐都医院全军骨科中心暨全军骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038;

2 济南军区总医院脊髓修复科 山东 济南 250000)

摘要 目的:通过构建携带针对 microRNA-194 的 shRNA 载体及过表达载体,包装慢病毒,感染人骨肉瘤细胞系 U2-OS,改变细胞内 microRNA-194 基因的表达水平,研究 microRNA-194 对细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响,为探索 microRNA-194 作为骨肉瘤生物治疗的新靶点提供理论和实验依据。**方法:**PCR 扩增 pri-miR-194 及 miR-194-5 成熟体,克隆于慢病毒载体 plenti-i GFP 中,转染大肠杆菌感受态细胞,收获并浓缩慢病毒颗粒,感染人骨肉瘤细胞系 U2-OS。进行 MTT,流式,平板克隆等试验。**结果:**1.重组慢病毒表达质粒构建正确,过表达及抑制过表达重组慢病毒的滴度分别为 1.5×10^8 TU/ml 及 4×10^8 TU/ml;2. microRNA-194 过表达的人骨肉瘤细胞系 U2-OS 细胞增殖速度,凋亡率及细胞周期相较于其它实验组都有明显变化 ($P < 0.01$)。**结论:**成功构建了 microRNA-194 过表达及抑制过表达慢病毒表达载体;miR-194 的表达水平对 U2-OS 细胞的增殖和凋亡造成显著影响。microRNA-194 可能成为骨肉瘤治疗的潜在新靶点,但该基因对骨肉瘤发生发展的作用及其机制尚待进一步研究。

关键词:microRNA-194;慢病毒;骨肉瘤;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R738 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)23-4401-05

Effects of MicroRNA-194 on Proliferation and Apoptosis of Human Osteosarcoma Cell Line U2-OS by Using Recombinant Lentivirus Vector*

HAN Kang^{1,2#}, ZHAO Ting-bao^{2#}, BIAN Na¹, CAI Cheng-kui¹, YAN Shi-ju¹, WANG Xin¹,XIAO Chun¹, SHA Hao¹, DONG Chuan¹, YANG Tong-tao¹, ZHOU Yong^{1Δ}, MA Bao-an^{1Δ}

(1 Department of Orthopedic Surgery Center and Orthopedic Oncology Institute of PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China; 2 Department of Spinal Cord Injury, General Hospital of Jinan Military Area Command of Chinese PLA, Jinan, Shandong, 250000, China)

ABSTRACT Objective: shRNA vector and expression vector of microRNA-194 were constructed to package lentivirus that could knock down or overexpress microRNA-194. MicroRNA-194 levels in Osteosarcoma Cell Line U2-OS were changed through lentivirus infection. Then the changes of cell proliferation rate and cell cycle were observed. All these would provide the foundation of theory and experiment to explore microRNA-194 as a new target of osteosarcoma therapy. **Methods:** Pri-miR-194 and mature miR-194-5 amplified by PCR was inserted into plenty-GFP vector, and then identified by restriction endonuclease digestion and nucleotide sequencing. Osteosarcoma Cell Line U2-OS was transfected with the Lentivirus. Then the cells were used in MTT, flow cytometry analysis and clone formation. **Results:** 1. Restriction analysis and sequencing proved that recombinant lentiviral expression vector was constructed correctly. The titer of obtained overexpression and suppression expression recombinant lentivirus was 1.5×10^8 TU/ml and 4×10^8 TU/ml. 2. The cell proliferation rate, the apoptosis ratio and the cell ratio of G0 / G1 phase of U2-OS were obviously different in different experimental group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The lentiviral expression vector for microRNA-194 was successfully constructed. microRNA-194 could influence Osteosarcoma Cell Line U2-OS proliferation rate, apoptosis ratio and cell cycle. microRNA-194 could be further explored as a potential target in Osteosarcoma therapy.

Key words: MicroRNA-194; Lentivirus; Osteosarcoma; Cell proliferation; Cell apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R738 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)23-4401-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81201633)

作者简介:韩康(1983-),男,博士研究生,研究方向:骨肿瘤的诊疗,电话:13572081887, E-mail: gan_7758525@163.com;

赵廷宝(1963-),男,主任医师,博士研究生,研究方向:骨缺损修复、脊柱外科,电话:(029) 3577591, E-mail: zhaotingbao @21cn.com

为共同第一作者

Δ 通讯作者:马保安(1962-),男,研究方向:骨肿瘤外科、创伤骨科及人工关节,主任医师,博士生导师,

E-mail: gukemba@fimmu.edu.cn

(收稿日期:2014-01-16 接受日期:2014-02-15)

前言

MicroRNAs(miRNAs)是一组广泛存在于动植物等真核细胞生物中 21~25nt 长的单链小分子 RNA^[1,2],通过对基因转录或翻译起到阻滞或调控的作用来进行表达。MiRNA 参与多项动植物的生命复杂活动的调控,在细胞增殖、器官形成、生长发育、细胞凋亡等水平调控基因组的表达,参与生命过程中一系列的重要进程^[3]。已有相关文献报道,miRNAs 表达的异常与恶性肿瘤的发生有着非常密切的关系^[4,5]。骨肉瘤是一类起源于间叶组织,原发于骨髓腔的高度恶性实体肿瘤。多以出现骨样组织或不成熟骨为特征。通过 X、CT 等影像学检查结合病理检查,较为容易的进行诊断。在儿童和青少年期多见,且预后极差。肺部转移可见于约 50%的患者,并成为最主要的骨肉瘤患者死亡原因^[6,7]。目前治疗以手术为主,化疗为辅。但容易产生耐药性,复发率高,且经济社会负担沉重^[8]。本研究通过构建 miR-194 过表达及抑制表达慢病毒表达载体,通过 MTT,细胞流式,平板克隆实验等实验方法研究 miR-194 对于骨肉瘤细胞系 U2-OS 增殖,凋亡以及周期的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株和主要试剂盒仪器

人成骨肉瘤细胞系 U2-OS 购于北京创联生物技术有限公司。高糖 DMEM 培养基、Opti-MEM1(optimum—minimum essential medium)去血清培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自上海微科试剂。shRNA 载体 pLKO.1-TRC cloning Vector 及阴性对照载体 pLKO.1-TRC control 购于美国 Addgene 公司。表达质粒载体 pLVX-AcGFP1-N1 购自 Clontech 公司。PCR 仪来自美国 Applied Biosystems 公司,positive clone 测序来自美季生物技术,稳压 DNA 电泳仪来自 BioRad 公司,细菌培养箱来自上海一恒科学仪器有限公司,Gilson 移液器来自吉尔森公司,高速离心机来自日立公司。

1.2 细胞培养

成骨肉瘤细胞系 U2-OS 细胞用高糖 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)中培养在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的孵箱条件下传代培养,实验用细胞均在其对数生长期提取。

1.3 MicroRNA-194 慢病毒载体的构建

1.3.1 PCR 扩增 通过 miRBase 序列数据库获得 micro-194 成熟序列及前体序列,根据其基因设计相应的引物。序列如下: hsa-mir-194-1: AUGGUGUUAUCAAGUGUAACAGCAAC UC-CAUGUGGACUGUGUACCAAUUCCAGUGGAGAUGCUG UUACUUUUGAUGGUUACCAA。其引物为: AGCTGTA-CAAGTAAGAGAACATGAATAAATCGAGAC。

hsa-miR-194-5p: UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA。其引物为: ccattgattcctcatattgc。引物由上海吉凯生物工程有限公司合成。上下游引物分别含有 NotI 和 MluI 酶切位点;以正常人基因组 DNA 为模板扩增,反应程序:94℃ 预变性 10 s,94℃ 变性 30 s,54.5℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环。纯化并回收 PCR 产物。

1.3.2 重组慢病毒载体的构建 用氯化钙制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞,将 microRNA 片段连接入线性化载体及转化,之

后进行阳性克隆的 PCR 鉴定及阳性克隆测序结果及结果分析。

1.3.3 慢病毒包装,收获,浓缩及滴度的测定 按 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 使用说明进行转染 293T 细胞,转染后 8 h 更换为完全培养基,培养 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,在 293T 细胞中测定并标定病毒滴度。用荧光法进行滴度的测定。

1.4 MTT 分析

实验将细胞分为 4 组:miRNA-194 上调组,空白病毒对照组,未转染组及 miRNA-194 下调组。每组细胞设 5 复孔,实验孔周边孔用无菌 PBS 充填,实验共重复 3 次。取 4 组稳定转染后的 U2-OS 细胞,离心计数后以每孔 2×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中,置于孵箱中进行培养。分别在之后 24 h,48 h,72 h,96 h,120 h,144 h 后,将 20 μ L MTT 溶液加入每孔,再置入孵箱 4h,将上清液小心吸出后,将 150 μ L DMSO 加入。在酶标仪中震荡 10 min,在 492 nm 处测每孔的光密度 OD 值。每组取 6 孔 OD 均值,绘制生长曲线(时间(d)为横坐标,吸光度(OD)为纵坐标)。

1.5 平板克隆形成实验

实验将细胞分为 4 组:miRNA-194 上调组,空白病毒对照组,未转染组及 miRNA-194 下调组。取 4 组稳定转染后的 U2-OS 细胞,消化,离心,吹悬。用梯度倍数将各组细胞悬液稀释计数后尽量均匀的加入到各实验皿中,使其密度为 500 个/皿。在孵箱静置培养 2~3 周,约 3-5 天进行换液。终止培养标准为出现肉眼可见的克隆(约 3 周)。纯甲醇固定,结晶紫溶液固定,用相机进行拍照,并肉眼直接计数克隆数量。克隆形成率公式为:克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 细胞周期和凋亡测定

细胞周期测定时,实验分为 4 组:miRNA-194 上调组,空白病毒对照组,未转染组及 miRNA-194 下调组。取 4 组稳定转染后的 U2-OS 细胞。消化离心后。凋亡组直接用相应培养基吹悬。周期组用预冷的 70%乙醇固定细胞吹悬固定。后分别经离心,磷酸盐缓冲液冲洗,1%碘化乙锭(PI)染色后,用 PBS 平衡盐溶液调整体积至 1 mL。将样品置入 BD—Aria FACS Calibur 流式细胞仪中检测细胞凋亡与周期。每组 3 个样本,实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

本实验数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,采用 SPSS 17.0 软件对多个样本均数进行重复测量的多因素方差分析及单因素方差分析,各均数间的两两比较行 q 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MicroRNA-194 慢病毒载体的构建

2.1.1 MicroRNA-194 基因扩增产物的鉴定 其基因的 PCR 产物经电泳分析,可见特异性条带,大小与预期一致。如(图 1)。

2.1.2 滴度的测定 其过表达慢病毒滴度为: 1.5×10^8 TU/ml,抑制过表达慢病毒滴度为 4×10^8 TU/ml。

2.1.3 感染复数(multiply of infection, MOI)值 测定过表达为: 100 TU/ml,抑制过表达及空白病毒对照为 50 TU/ml。

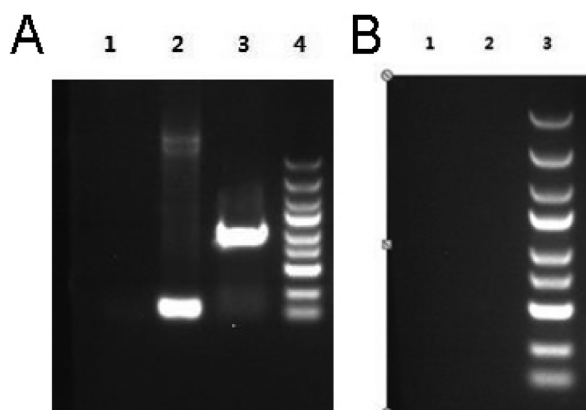


图1 A:miRNA-194 过表达电泳图 1#: 阴性对照(ddH₂O) 2#: 阴性对照(空载自连对照组) 3#: 阳性对照(GAPDH) 4#: Marker。

B:miRNA-194 抑制表达电泳图 1#: 阴性对照(ddH₂O)

2#: 阴性对照(空载自连对照组) 3#: Marker

Fig. 1 A:miRNA-194 electrophoretogram of overexpression 1#:negative control(ddH₂O) 2#:negative control(no-load control) 3#:positive control(GAPDH) 4#:Marker. B:miRNA-194 electrophoretogram of suppression expression 1#:negative control(ddH₂O) 2#:negative control(no-load control) 3#: Marker

2.1.4 嘌呤霉素筛选及获取目的细胞 可见最佳筛选浓度为0.5 μg/ml,抑制过表达及空白对照慢病毒转染细胞最佳筛选浓度为1 μg/ml。经筛选后获得满意目的细胞,转染及筛选效率>90%(图2)。

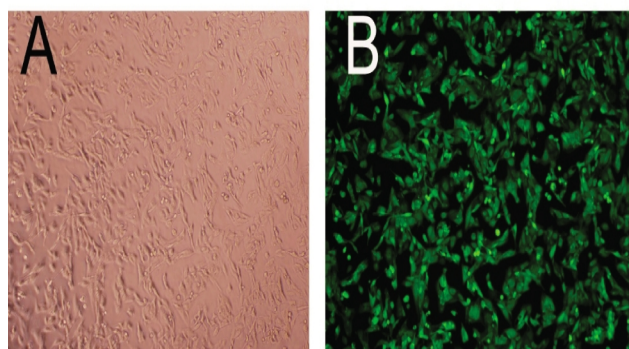


图2 骨肉瘤 U2-OS 细胞经慢病毒载体转染及嘌呤霉素筛选后,获取目的细胞。A 为白光视野,B 为相对应绿色荧光视野。放大倍数为

(100×)

Fig. 2 U2-OS cells were observed with white bright (left) and green fluorescence assay (right) in the same vision using fluorescence microscopy (100×)

2.2 miR-194 模拟物对 U2-OS 细胞增殖的影响

2.2.1 MTT 绘制了4组细胞(上调组、空白病毒对照组、未转染细胞组及下调组)的生长曲线,结果显示,同其他组相比,miR-194 上调组细胞的增殖能力明显下降($P<0.05$),下调组增殖能力明显上升($P<0.05$)。而未转染细胞组与空白病毒对照组细胞的增殖能力没有显著差别($P>0.05$)(图3)。

2.2.2 平板克隆实验 实验分为4组细胞(上调组、空白病毒对照组、未转染细胞组及下调组),结果显示,同其他组相比,上调组细胞的增殖能力明显下降($P<0.05$),下调组增殖能力明显上

升($P<0.05$)。而未转染细胞组与空白病毒对照组细胞的增殖能力没有显著差别($P>0.05$)。(图4)

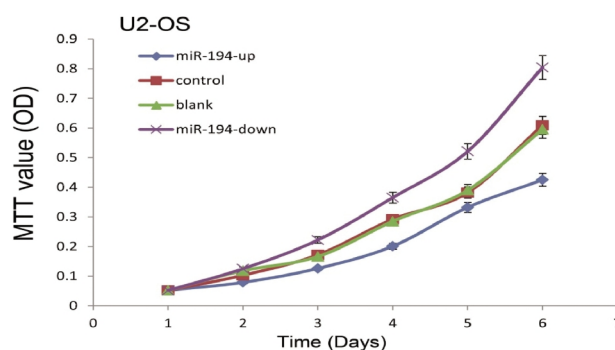


图3 miRNA-194 上调,下调,空白病毒对照及未转染组 U2-OS 细胞的生长曲线图。每一个 OD 值以平均值与标准差的形式进行表达

Fig. 3 After transfection, every 24 h, MTT assay was performed on four groups of U2-OS cells. The viable cell number was evaluated as the value of the absorbance at 490 nm with a reference wavelength of 630 nm.

Values of optical density (OD) are expressed as means±SD. Point symbol, mean of four independent experiments; bars, SD

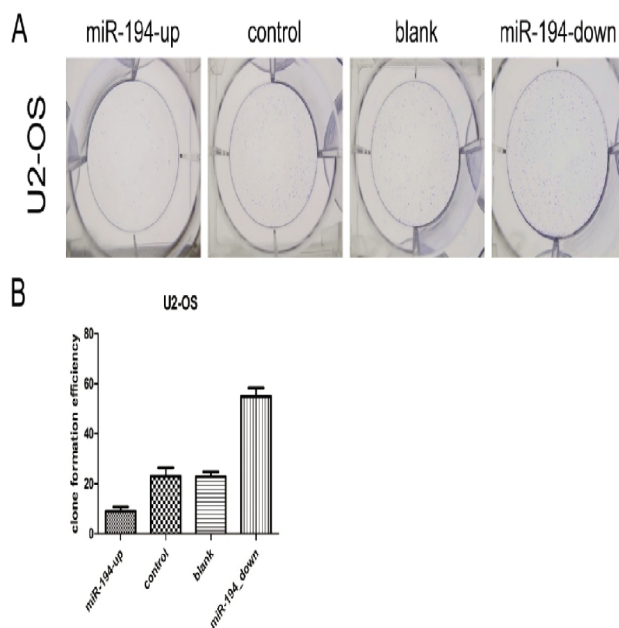


图4 不同实验组的 U2-OS 细胞平板克隆实验结果。21 天后克隆被拍摄并计数。结果用均数±标准差进行表示

Fig. 4 Effect of miR-194 on the clone formation in U2-OS cells.

The clone formation of U2-OS cells was captured and counted after 21 d of culture. Columns, mean of four independent experiments; bars, SD

2.3 miR-194 表达对 U2-OS 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示,上调组和其他3组相比,处于G0/G1期的细胞比例显著增多,同时G2/M期的细胞比例及S期细胞比例显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。下调组和其他3组相比,处于G0/G1期的细胞比例显著减少,G2/M期的与S期细胞比例显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$)。空白病毒对照细胞组与未转染细胞组相比,处于各期细胞比例差异无统计学意义($P>0.05$)(图5)。

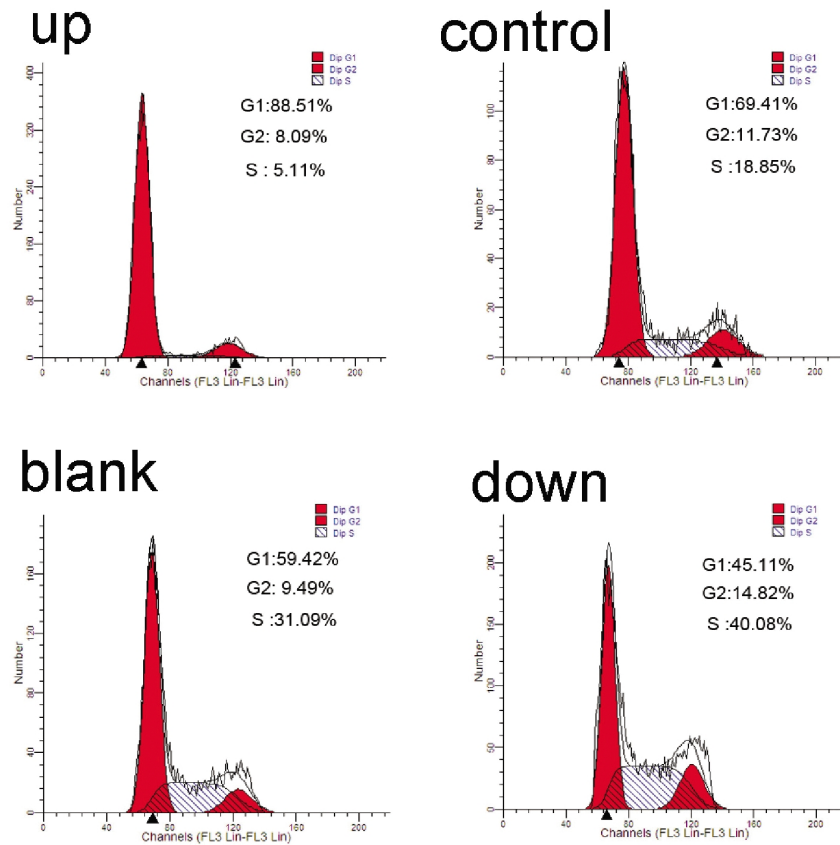


图 5 miR-194 上调,下调,空白病毒对照及未转染组 U2-OS 细胞的细胞周期通过流式细胞仪进行测定

Fig. 5 Cell cycle distribution of treated U2-OS was measured using flow cytometry analysis

2.4 miR-194 对 U2-OS 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,同其他 3 组相比,上调组细胞的凋亡率明显上升($P < 0.05$),下调组凋亡率明显下降($P < 0.05$)。

而未转染细胞组与空白病毒对照组细胞的凋亡率没有显著差别($P > 0.05$)(图 6)。

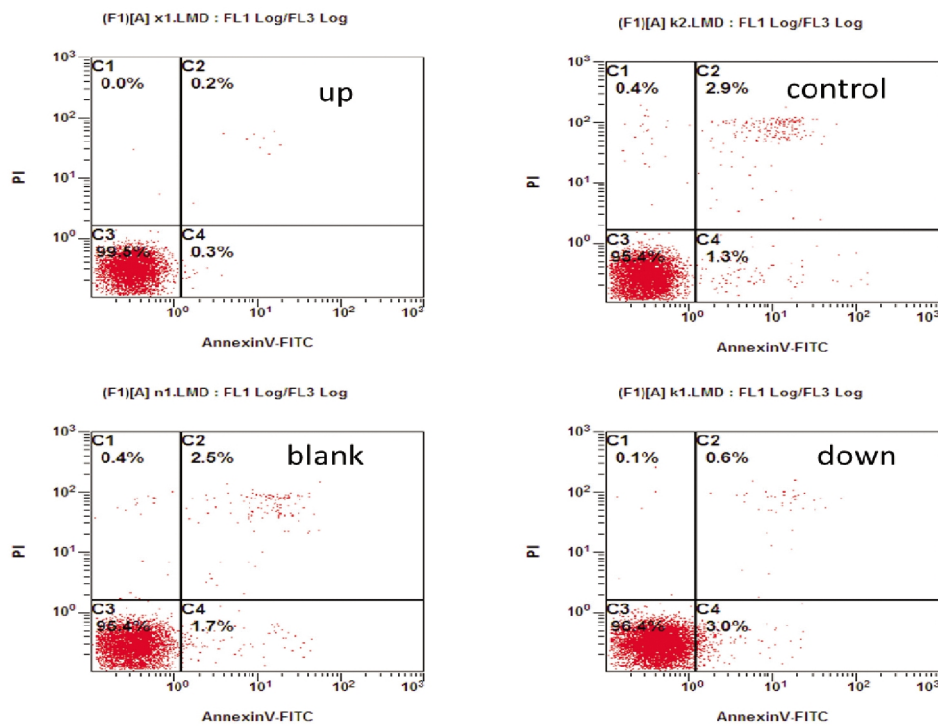


图 6 miR-194 上调,下调,空白病毒对照及未转染组 U2-OS 细胞的凋亡率通过流式细胞仪进行测定

Fig. 6 Apoptosis of U2-OS cells were measured by FACS with Annexin V and propidium iodide staining

3 讨论

后基因组时代,主要表现为 RNA 的调控,而其中,miRNA 毫无疑问是最重要的调控家族之一。miRNAs 在动植物的细胞增殖,代谢,肿瘤形成,转移等功能中,都起到重要的作用。据相关文献报道^[9],miRNA 具有以下特征:1.在个体发育中起着极其重要的作用;2.与原癌基因的调控有关;3.参与了多种组织,在不同组织中有着不同的表达;4.参与病毒感染的过程。同时,在多种类型的恶性肿瘤中,miRNA 起着癌基因或者抑癌基因的作用,从而使 miRNA 成为可能的新型肿瘤生物标记信号^[10]。在肺癌,白血病,肝癌,神经胶质瘤等多种恶性肿瘤中,都有相关文献报道,miRNA 对肿瘤的增殖及转移起到重要作用^[11-13]。正是由于 miRNA 在肿瘤发生,增殖,转移等机制中起着关键的作用,尤其是与肿瘤转移的密切相关性,因此,如果能在特定肿瘤中找出其相关的特定 miRNA,能够为肿瘤的早期诊断、肿瘤分类及分子靶向治疗等提供新的靶点和研究思路。

最近几年,已有相关文献报道,miRNA-194 在许多肿瘤中都有异常表达^[14,15],如在结肠癌^[16],食管癌^[17]等肿瘤细胞中。Venugopal SK^[18]等的研究表明,miRNA-194 在肝细胞的中为高表达,其表达受 HNF-1a 等多种因素调控和调节,可通过抑制肝星状细胞的激活,从而起到抑制肝的纤维化的作用。同时,miRNA-194 还有可能受 P53 基因的调节,P53 基因的异常表达已被证实与肿瘤的发生、调控有着密切的关系^[16]。我们推测 miR-194 可能与肿瘤的增殖、凋亡、细胞周期及转移等性状有关,因此本实验选择 miR-194 为研究对象。研究 miR-194 的在骨肉瘤细胞中的生物学功能。但是,在国内外研究中,关于 miRNA-194 对于骨肿瘤的作用和影响的研究较少。尤其是利用慢病毒技术构建稳定转染的细胞系进行相关实验的更少。

慢病毒技术是分子生物学和细胞生物学的基本研究工具。它的优点主要包括:1.可以感染大多数的分化或未分化细胞;2.相对容易建立稳定转染的细胞株;3.可以稳定的整个到宿主基因组中;4.较为简便的适应于报告系统。利用 miRNA 的生成过程。加入相应 miRNA 的前体或其成熟体的相对应序列的双链结构,便可以实现相对应的上调及下调 miRNA。

本实验便利用慢病毒技术,首先构建慢病毒载体,从而获得 MicroRNA-194 的沉默及过表达,进行 MTT,细胞流式,平板克隆实验等实验,同时为了使实验更具有科学性和严谨性,对照组共设为 2 组:空白病毒对照组及未转染细胞组,以排除病毒本身对该实验结果的影响。实验结果提示:miR-194 对于成骨肉瘤细胞系 U2-OS 具有抑制细胞增殖、促进凋亡,使细胞周期停滞的作用,从而提示 miRNA-194 有可能是骨肉瘤的抑癌基因。

目前对 miR-194 如何调控骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭力的作用机制有待深入的研究,后续工作有待开展。下一步可利用已经构建完毕的 miR-194 稳定转染表达的骨肉瘤 U2-OS 细胞系,构建原位裸鼠肺转移模型,通过比较各组皮下肿瘤的生长速度,体积大小,重量,转移情况等指标差异,验证 miR-194 对于骨肉瘤成瘤及肺转移的影响。并尝试通过荧光实时定量 PCR,荧光素酶基因报告实验,western 等实验寻找 miR-194 的靶基因,从而揭开 miR-194 的作用机制。

参考文献(References)

- [1] Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential [J]. Cell, 2001, 107: 823-826
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116: 281-297
- [3] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. Developmental cell, 2006, 11: 441-450
- [4] Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors[J]. Developmental biology, 2007, 302: 1-12
- [5] Cheng Q, Yi B, Wang A, et al. Exploring and exploiting the fundamental role of microRNAs in tumor pathogenesis [J]. OncoTargets and therapy, 2013, 6: 1675-1684
- [6] Clark JC, Dass CR, Choong PF. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma [J]. Journal of cancer research and clinical oncology, 2008, 134: 281-297
- [7] Kansara M, Thomas DM. Molecular pathogenesis of osteosarcoma[J]. DNA and cell biology, 2007, 26: 1-18
- [8] Xia T, O'Hara A, Araujo I, et al. EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3 [J]. Cancer research, 2008, 68: 1436-1442
- [9] Deng S, Calin GA, Croce CM, et al. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer[J]. Cell cycle (Georgetown, Tex), 2008, 7: 2643-2646
- [10] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435: 834-838
- [11] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. Cell, 2005, 120: 635-647
- [12] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99:15524-15529
- [13] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. Cancer research, 2005, 65: 6029-6033
- [14] Georges SA, Biery MC, Kim SY, et al. Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215[J]. Cancer research, 2008, 68: 10105-10112
- [15] Song B, Wang Y, Kudo K, et al. miR-192 Regulates dihydrofolate reductase and cellular proliferation through the p53-microRNA circuit [J]. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2008, 14: 8080-8086
- [16] Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, et al. p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest [J]. Cancer research, 2008, 68: 10094-100104
- [17] Krutzfeldt J, Rosch N, Hausser J, et al. MicroRNA-194 is a target of transcription factor 1 (Tcf1, HNF1alpha) in adult liver and controls expression of frizzled-6[J]. Hepatology (Baltimore, Md), 2012, 55:98-107
- [18] Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, et al. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation [J]. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology, 2010, 298: G101-106